INSTRUÇÕES PARA COLHEITA, CONSERVAÇÃO E REMESSA DE AMOSTRAS AO LABORATÓRIO PARA DIAGNÓSTICO DE FEBRE AFTOSA E DOENÇAS CONFUNDÍVEIS.

Jorge Ribeiro dos Reis
FFA/LANAGRO-PA

Ursulla de Mesquita Tavares
Méd. Vet. /ADEPARÁ

2007

LANAGRO-PA

COLHER E CONSERVAR AMOSTRAS DE EPITÉLIOS E SORO SANGUÍNEO

---

1 OBJETIVO

Este documento descreve os procedimentos técnicos para colheita e conservação de amostras de epitélio e soro sangüíneo destinadas ao isolamento de vírus e provas sorológicas, respectivamente, para diagnóstico laboratorial de febre aftosa e doenças confundíveis.

2 PROCEDIMENTOS

2.1 Providenciar os materiais e outros, necessários à execução da operação.

2.2 Selecionar animais que apresentem sinais clínicos da doença (vesículas) e que não tenham recebido nenhum tipo de tratamento, inclusive tratamento local (tópico), para colheita de epitélio. Colher soro dos animais dos quais foram colhidos epitélios e de animais convalescentes.

Obs.: As amostras de epitélio devem ser colhidas logo após o aparecimento dos sinais clínicos, considerando que é na fase aguda que há maior excreção de vírus; é recomendada a colheita de duas amostras de soro sangüíneo para sorologia pareada, sendo a primeira amostra colhida junto com epitélio e a segunda amostra colhida do mesmo animal, de duas a três semanas após a primeira, na fase de convalescença.

2.3 Tomar todas as precauções para evitar a transmissão eventual de vírus:

- observar os cuidados gerais de biossegurança durante a colheita das amostras, como: uso de macacão, luva, máscara, touca e pantufa (para calçados), todos descartáveis;
- trocar as luvas após cada colheita;
- imergir os materiais utilizados na colheita, imediatamente após o uso, em um recipiente contendo solução desinfetante (ácido cítrico 1% + ácido acético 0,5%) e, em seguida, lavar em água corrente, antes de serem reutilizados em outros animais;
- embalar em sacos plásticos, imediatamente após o término das colheitas, macacão, luva, máscara, touca e pantufa; todo esse material deve ser enterrado ou incinerado;
- lavar as mãos e braços, primeiro com solução desinfetante e a seguir com água corrente, após o término das colheitas.

2.4 Fazer a contenção de forma adequada para evitar acidentes tanto para os animais como para o operador.

2.5 Realizar a colheita das amostras de epitélio, em quantidade não inferior a 2 gramas, utilizando materiais esterilizados – uma tesoura de ponta romba e uma pinça anatômica – procedendo da seguinte forma:

Colheita de epitélio oral:

- abrir a boca do animal e tracionar a língua para fora;
- colher de preferência vesículas intactas ou bordas das aftas;

Colheita de epitélio podal:

- lavar as patas com água limpa para retirar materiais estranhos;

- colher de preferência vesículas intactas ou bordas das aftas;

2.6 Colocar as amostras de epitélio colhidas em frasco de boca larga (coletor universal), estéril, previamente identificado com o nome da propriedade e tipo de epitélio (oral, podal) e contendo líquido de valleé em quantidade suficiente para que as amostras fiquem submersas; utilizar um frasco para epitélio oral e outro para epitélio podal. Em caso de colheita inferior a 2 gramas de epitélio, pode-se juntar num mesmo frasco, epitélio de dois ou mais animais, de modo a se obter uma quantidade mínima de 2 gramas.

Obs.: Observar se o líquido de valleé apresenta qualquer alteração e em caso positivo desprezar e utilizar outro em boas condições. O liquido de valleé deve ser conservado à temperatura de 4 ºC a 8 ºC e, caso não haja refrigerador, mantido em local fresco.

2.7 Fechar hermeticamente os frascos contendo as amostras de epitélio e vedar com fita adesiva.

2.8 Desinfetar externamente os frascos com solução desinfetante e manter refrigerados em caixa isotérmica com gelo.

2.9 Realizar a colheita das amostras de soro sangüíneo, utilizando “vacutainer”, através da sangria da veia jugular. Colher um volume de aproximadamente 5 mL de sangue e manter os tubos com as amostras de sangue colhidas inclinados, enquanto ocorre a coagulação.

2.10 Transferir os soros obtidos para microtubos de 2 mL, previamente identificados; a quantidade obtida de soro sem nenhum conservante não deve ser inferior ao volume de 1,5 mL por animal.

2.11 Fechar hermeticamente os microtubos e manter refrigerados em caixa isotérmica com gelo.

2.12 As amostras de epitélio e soro devem ser enviadas ao laboratório no menor espaço de tempo possível.

Nota: Para efeito de diagnóstico laboratorial de febre aftosa e doenças confundíveis, têm prioridade as amostras de epitélio oral, epitélio podal e epitélio das glândulas mamárias e, em caso de necropsia, podem ser obtidas amostras do miocárdio (regiões estriadas – comum em suínos e bovinos jovens) e vesículas encontradas no aparelho digestivo (pilares do rúmen – comum em bovinos). Além de febre aftosa e estomatite vesicular, são realizados exames com as amostras de soro para rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), diarréia viral bovina (BVD) e língua azul .

Referências:

1) MANUAL DE INSTRUÇÕES PARA COLHEITA, CONSERVAÇÃO E REMESSA DE MATERIAL PARA
LABORATÓRIO
LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO EM RECIFE– LANAGRO/PE

2) MANUAL DE DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMIDADES VESICULARES
CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA

3) MANUAL DE COLECTA, ENVIO E PREPARACION DE MUESTRAS PARA PRUEBAS DE DIAGNOSTICO
DE LAS ENFERMIDADES VESICULARES
CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA Y ZOONOSIS

COLHER E CONSERVAR AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO

1 OBJETIVO

Este documento descreve os procedimentos técnicos para colheita e conservação de amostras de soro sanguíneo.

2 PROCEDIMENTOS

2.1 Identificação dos animais:

Os animais que não possuírem identificação (brinco, tatuagem, mossa) deverão ser brincados na orelha esquerda, na parte ventral e porção distal, evitando-se as ranhuras do pavilhão auricular. Deverá ser feita assepsia local com Iodofor 1:200, conforme *anexo 5* . A face do brinco com o número de identificação deverá ficar exposta para facilitar a leitura. Após este procedimento, aplicar "repelente/spray cicatrizante" no local.

Nos inquéritos sorológicos, seguir as orientações dos manuais específicos fornecidos pelo Departamento de Defesa Animal do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

Obs.: A lista com os materiais necessários para colheita de soros sanguíneos destinados a sorologia de Febre Aftosa e confundíveis se encontra no *anexo 4.*

2.2 Preenchimento do formulário de colheita e rótulo do tubo vacutainer

A requisição de exames e o formulário de colheita devem ser preenchidos com caneta esferográfica (ou outra forma de identificação indelével) e letra legível, observando-se todos os campos em aberto, conforme modelos *anexos 6 e 7*. Registrar cuidadosamente o número de identificação do animal no tubo de colheita em rótulo de esparadrapo com caneta esferográfica, conferindo o mesmo com o número registrado no formulário. Para substituir essa forma de identificação, é necessário que a alternativa a ser empregada seja anteriormente testada. No formulário, o número do animal deve ser seguido da letra que indique o tipo de identificação que recebeu, sendo B = Brinco; T = Tatuagem; F = Marca de fogo; M = Mossa. Não deve haver numeração repetida nos frascos e nos formulários.

2.3 Colheita de amostras

Após a assepsia local com Iodofor 1:200 ou Álcool Iodado, proceder à sangria na jugular do animal, utilizando agulha individual. Caso sejam usados tubos vacutainer, a agulha própria deve ser ajustada no aplicador e introduzida na jugular, sendo o tubo pressionado, perfurando com a outra ponta da agulha o tapume de borracha. O sangue fluirá para dentro do tubo não devendo ultrapassar 60% da capacidade total (aproximadamente 6 mL).

2.4 Preparo da amostra

- Manter o sangue em repouso até dessorar (temperatura ambiente, inclinação aproximada de 45º). Caso não haja dessoramento, retalhar o coágulo com estilete individual;

- Centrifugar o sangue, se possível, visando melhor qualidade da amostra (3.000 a 5.000 rpm / 5-8 min);

- Transferir o soro (mínimo 1 mL e no máximo 50% da capacidade do frasco, deixando espaço suficiente para expansão do soro no processo de congelamento) com o mesmo número do tubo de origem;

- Tanto a centrifugação quanto a transferência do soro para o frasco deverão ser realizados em ambiente fechado e limpo de forma a minimizar a contaminação;

- Tampar os frascos;

- Desinfetar externamente os frascos, borrifando-os com solução de Ácido Cítrico a 0,2% *(anexo* 5*)* certificando-se de que as tampas de borracha dos frascos estejam bem ajustadas;

- Agilizar a secagem dos frascos colocando-os sobre papel toalha;

- Acondicionar os frascos já secos na posição vertical (em suportes próprios no caso de frascos tipo "eppendorf"), em sacos plásticos, contornando essa embalagem com fita adesiva (principalmente as laterais) para firmá-la e vedá-la externamente a embalagem;

- Identificar a embalagem com o nome do proprietário e da propriedade e acondicionar em caixa isotérmica com gelo;

- Conservar as amostras na posição vertical à –20ºC ou sob refrigeração, se forem enviadas em até 48 horas;
  - Realizar a colheita das amostras de soro sangüíneo de 2 a 3 animais por foco ou de acordo com a necessidade no caso de trânsito, inquérito soroepidemiológico e vigilância, em se tratando de Febre Aftosa; em se tratando do diagnóstico das enfermidades vesiculares confundíveis e A.I.E, também realiza-se a colheita de acordo com a necessidade.

Nota: Para efeito de diagnostico laboratorial de febre aftosa e doenças confundiveis, tem prioridade as amostras de epitélio oral, epitélio podal e epitélio das glândulas mamárias e em caso de necropsia podem ser obtidas amostras do miocardio (regiões estriadas – comum em suínos e bovinos jovens) e vesículas encontradas no aparelho digestivo (pilares do rúmen – comum em bovinos). Além de Febre Aftosa e Estomatite Vesicular, realizar exames com a amostra de soro para Rinotraqueíte infecciosa bovina (IBR), Diarréia Viral Bovina (BVD) e Língua Azul.

LANAGRO-PA

COLHER E CONSERVAR AMOSTRAS DE MUCO ESOFÁGICO-FARÍNGEO

---

1 OBJETIVO

Este documento descreve os procedimentos técnicos para colheita e conservação de amostras de muco esofágico-faríngeo, destinadas à prova de "probang" para isolamento de vírus da febre aftosa.

2 PROCEDIMENTOS

2.1 Providenciar os materiais e outros, necessários à execução da operação;

2.2 Identificar e separar os animais, deixando em jejum durante, pelo menos, 12 horas.

Obs.: Administrar água aos animais uma hora antes da colheita para eliminar eventuais restos alimentares e umedecer a região esofágica-faringeana, facilitando assim a penetração do coletor, bem como o raspado da mucosa.

2.3 Tomar todas as precauções para evitar a transmissão eventual de vírus:

- observar os cuidados gerais de biossegurança, durante a colheita das amostras, como: o uso de macacão, luva, máscara, touca e pantufa (para calçados), todos descartáveis;
- trocar as luvas após cada colheita;
- usar um copo coletor para cada animal;
- à medida que os copos coletores forem sendo utilizados, devem ser imersos, imediatamente após o uso, em um recipiente contendo solução desinfetante (ácido cítrico 1% + ácido acético 0,5%) e em seguida lavados com água corrente, antes de serem reutilizados em outros animais;
- embalar em sacos plásticos, imediatamente após o término das colheitas, macacão, luva, mascara, touca e pantufa; todo esse material deve ser enterrado ou incinerado;
- lavar as mãos e braços com solução desinfetante e a seguir com água corrente após o término das colheitas.

2.4 Fazer a contenção de forma adequada para evitar acidentes tanto para os animais como para o operador.

Obs.: A propriedade deve possuir instalações apropriadas, que proporcionem uma contenção adequada e possibilite que a cabeça do animal fique imobilizada e voltada para cima, mantendo uma posição adequada e cômoda para a realização da colheita. Evitar o uso de tranqüilizantes.

2.5 Realizar a colheita de muco esofágico-faríngeo, procedendo da seguinte forma:

- abrir a boca do animal pressionando a língua para baixo;
- introduzir o coletor pela comissura labial com cuidado até atingir a faringe e a porção anterior do esôfago e em seguida, fazer um raspado da mucosa esofágico-faringeana, por meio de movimentos suaves (3 a 4 vezes) antes da retirada do coletor;

Obs.: É possível que durante a manobra de raspagem da mucosa, o animal tenha reflexo de vômito e prejudique desta maneira a colheita da amostra. No caso do animal regurgitar material ruminal, desprezar a amostra colhida e fazer outra tentativa de colheita, após deixar o animal em repouso por alguns minutos. Esse procedimento deve ser repetido até que a colheita tenha sido bem sucedida.

2.6 Retirar o coletor e transferir o conteúdo do copo para um frasco de boca larga (coletor universal), esterilizado e previamente identificado com o nome da propriedade e número do animal.
2.7 Adicionar igual volume de meio de transporte (meio Earle, pH 7,4 a 7,6).
2.8 Fechar hermeticamente o frasco contendo a amostra, vedar com fita adesiva e agitar o frasco para homogeneizar a amostra colhida com o meio de transporte;
2.9 Desinfetar externamente os frascos com solução desinfetante e manter refrigerados em caixa isotérmica com gelo. Tão logo seja possível, as amostras colhidas devem ser congeladas e enviadas ao laboratório no menor espaço de tempo, após a colheita.

Nota: A colheita de muco esofágico-faríngeo deve ser realizada com auxílio de coletores desenvolvidos por Grae & Tallgren (1935) para bovinos e bubalinos e por Burrows (1968) para ovinos e caprinos.
Os coletores consistem de um copo de metal (aço inoxidável) com fundo e bordas arredondadas e fixo pelo centro da parte interna a uma haste curva com aproximadamente 50 cm de comprimento.
Os copos dos coletores para bovinos adultos medem 3,0 cm de diâmetro por 5,0 cm de altura enquanto os utilizados para bovinos jovens medem 2,5 cm de diâmetro por 4,5 cm de altura.

Referências:

1) GUIA PARA A COLHEITA, PROCESSAMENTO E ISOLAMENTO DO VÍRUS DE FEBRE AFTOSA A PARTIR DE MATERIAL ESOFÁGICO-FARÍNGEO DE RUMINANTES
CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA
2) PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – SETOR DE DIAGNÓSTICO
LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO EM CAMPINAS– LANAGRO/SP
3) MANUAL DE INSTRUÇÕES PARA COLHEITA, CONSERVAÇÃO E REMESSA DE MATERIAL PARA
LABORATÓRIO
LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO EM PERNAMBUCO– LANAGRO/PE
4) MANUAL DE DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMIDADES VESICULARES
CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
5) MANUAL DE COLECTA, ENVIO E PREPARACION DE MUESTRAS PARA PRUEBAS DE DIAGNOSTICO
DE LAS ENFERMIDADES VESICULARES
CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA Y ZOONOSIS

LANAGRO-PA

REMETER AMOSTRAS DE EPITÉLIOS, SORO SANGUÍNEO E MUCO ESOFÁGICO-FARÍNGEO AO LABORATÓRIO

---

1 OBJETIVO

Este documento descreve os procedimentos técnicos para remeter ao laboratório amostras de epitélio, soro sangüíneo e muco esofágico-faríngeo para provas laboratoriais de diagnósticos.

2 PROCEDIMENTOS

2.1 Providenciar os materiais e outros, necessários à execução da operação.

2.2 Congelar as amostras de muco esofágico-faríngeo antes de serem enviadas ao laboratório e, de preferência, também os soros, sem coágulos ou hemácias, devem ser congelados antes de serem enviados ao laboratório.

2.3 Os frascos contendo amostras de epitélio e muco esofágico-faríngeo devem ser embalados individualmente em sacos resistentes; os microtubos contendo soro podem ser embalados em um mesmo saco. Em seguida, os frascos são agrupados em lotes e embalados novamente em sacos maiores e mais resistentes, forrados com algodão ou outro material absorvente, como medida de segurança para prevenir eventuais danos com possível extravasamento do conteúdo.

2.4 Acondicionar as amostras em caixa isotérmica, refrigeradaS com gelo ou sachês congelados, em quantidade apropriada para durabilidade compatível com o tempo previsto para chegada ao laboratório; lacrar a tampa da caixa isotérmica com fita adesiva.

Obs.: A caixa isotérmica deve ser identificada externamente, na lateral, com uma etiqueta contendo o símbolo de Risco Biológico (anexo) e o nome e endereço do remetente e do laboratório de destino, inclusive com numero de telefone, fax e e-mail.

2.5 Despachar a caixa isotérmica ao laboratório o mais rapidamente possível, através do transporte mais seguro disponível, acompanhada da seguinte documentação:

Análise destinada a trânsito animal:

- ofício de solicitação do exame PROBANG;
- formulário de colheita que identifica a propriedade, o proprietário e os animais individualmente (nº do brinco, sexo, idade, raça e etc), assinado pelo Médico Veterinário responsável pela colheita;
- requerimento para ingresso de animais susceptíveis à febre aftosa na zona livre de febre aftosa com vacinação (anexo II da Instrução Normativa SDA nº 182 de 20 de novembro de 2003), se aplicável; e
- resultado da sorologia (ELISA 3ABC/EITB), atestando que os animais são reagentes para as proteínas não estruturais do vírus da febre aftosa.

Análise destinada a diagnóstico:

- ofício de solicitação do exame PROBANG; e
- Form-in ou Form-com.

Análise destinada a inquérito/monitoramento de febre aftosa:

- ofício de solicitação do exame PROBANG; e
- ficha de inquérito ou de monitoramento de febre aftosa.

2.6 Comunicar ao laboratório através de e-mail, fax ou telefone, informando da remessa das amostras, fornecendo o nome da empresa transportadora, número do conhecimento e horário previsto para chegada.

Obs.: A documentação mencionada deve ser colocada em um envelope pardo e este afixado com fita adesiva na tampa da caixa isotérmica, para evitar extravio durante o transporte.

Referências:

1) GUIA PARA A COLHEITA, PROCESSAMENTO E ISOLAMENTO DO VÍRUS DE FEBRE AFTOSA A PARTIR DE MATERIAL ESOFÁGICO-FARÍNGEO DE RUMINANTES
CENTRO PANAMERICANO DE FEBRE AFTOSA
2) PROCEDIMENTO OPERACIONAL PADRÃO – SETOR DE DIAGNÓSTICO
LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO EM CAMPINAS– LANAGRO/SP
3) MANUAL DE INSTRUÇÕES PARA COLHEITA, CONSERVAÇÃO E REMESSA DE MATERIAL PARA LABORATÓRIO
LABORATÓRIO NACIONAL AGROPECUÁRIO EM PERNAMBUCO– LANAGRO/PE
4) MANUAL DE DIAGNOSTICO DE LABORATORIO DE LAS ENFERMIDADES VESICULARES
CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA
5) MANUAL DE COLECTA, ENVIO E PREPARACION DE MUESTRAS PARA PRUEBAS DE DIAGNOSTICO DE LAS ENFERMIDADES VESICULARES
CENTRO PANAMERICANO DE FIEBRE AFTOSA Y ZOONOSIS

Anexo

Risco Biológico